

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันมนุษย์ประสบปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น เนื่องจากการใช้ชีวิตประจำวันที่เน้นเรื่องความสะดวกสบาย และพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคเมธิ่ง ระบบภูมิคุ้มกันลดลง ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น หรือแม้แต่โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ เช่น ท้องผูก ท้องร่วง และการปนเปื้อนเชื้อโรคในทางเดินอาหาร เป็นต้น

ทำให้มนุษย์หันมาให้ความสำคัญต่อสุขภาพกันมากขึ้น เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เหล่านี้ พบว่าการรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกายสามารถลดปัญหาการเกิดโรคต่างๆ เหล่านี้ได้ ซึ่งการเจริญของโปรไบโอติกและการส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้นนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่รับประทานเข้าไป ดังนั้นมนุษย์จึงหันมาให้ความสำคัญต่อการรับประทานอาหารกันมากขึ้น อาหารที่มนุษย์รับประทานเข้าไบนั้นนอกจากจะได้สารอาหารที่จำเป็นและมีประโยชน์ต่อร่างกายแล้วยังมีส่วนที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ซึ่งเมื่อเคลื่อนที่ไปยังลำไส้ใหญ่จะเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น เช่น อาหารที่เป็นเส้นใยหรือคาร์โบไฮเดรตต่างๆ ซึ่งสามารถไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีประโยชน์ต่อร่างกายให้สามารถเจริญได้ดีโดยที่สารอาหารดังกล่าวเรียกกันว่า โปรไบโอติก ซึ่งเป็นสารที่ไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์หรือโปรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ (Gibson, 2004) สารโปรไบโอติกสามารถพบได้ในพืชผักต่างๆ เช่น พืชตระกูลหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว และในธัญพืชต่างๆ สารโปรไบโอติกมักเป็นสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เช่น oligosaccharides, resistant starch (RS), หรือไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (Non-starch polysaccharide, NSP) เช่น โคลโตแซน และเส้นใยอาหาร ทั้งนี้รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพลคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไชแตน ซึ่งไม่ถูกย่อยและถูกดูดซึมโดยร่างกายมนุษย์ และเหลือเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้ในการเจริญเติบโต และส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ให้ดีขึ้น เช่น ผลิตวิตามิน (บี1, บี2) เพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ (แคลเซียม, แมกนีเซียม) ลดการติดเชื้อในทางเดินอาหาร ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ช่วยลดอาการท้องผูก

ท้องเสีย และผลิตกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท บิวเทอเรท และโพรพิโอเนท (Gibson *et al.*, 1995, Chonan *et al.*, 1995) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้จะถูกนำไปใช้โดยเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย และมีผลในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยบิวเทอเรทมีผลไปกระตุ้นการเกิด apoptosis ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ทำให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง (Hughes and Rowland, 2001)

ปัจจุบันมีนักวิจัยให้ความสนใจในการนำสารพรีไบโอติกมาเป็นองค์ประกอบของอาหาร (food ingredient) เพื่อช่วยปรับปรุงสุขภาพของผู้บริโภค เช่น ในเครื่องดื่ม และนมหมัก เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ คุกกี้ ชีส ขนมปังกรอบ ผลิตภัณฑ์นมเด็ก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาค้นคว้าหาสารอาหารซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก และส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งงานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการศึกษาถึงแหล่งของพรีไบโอติกที่มีอยู่ในพืชหัวเพื่อให้ได้รับทราบถึงข้อมูลของแหล่งสารพรีไบโอติกที่มีอยู่ในพืชหัวมากขึ้น และสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกและสุขภาพของมนุษย์มากที่สุด

บทตรวจเอกสาร

1. โพรไบโอติก

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ โดยส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มแบคทีเรียพวก *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ อีกที่มีการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติว่าเป็นโพรไบโอติก ดังแสดงในตารางที่ 1 แบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* เป็นกลุ่มที่นำมาใช้ในมนุษย์โดยเสริมในผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมัก เช่น *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. longum* และ *B. infantis* เป็นต้น สายพันธุ์ที่นำไปใช้ในสัตว์ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* และ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาผลิตขายทางการค้าทั้งที่นำไปใช้กับมนุษย์ และ สัตว์ สายพันธุ์ที่นิยม คือ *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. bifidum* และ *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรียโพรไบโอติกส่วนใหญ่สามารถหมักสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตได้เป็นกรดแลคติก จัดเป็นจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ แบคทีเรียโพรไบโอติกบางสายพันธุ์ช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ช่วยการขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น (Saarela *et al.*, 2002) ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) และ *Bifidobacterium lactis* Bb-12 สามารถป้องกันการเกิดท้องเสียในเด็ก และยังสามารถช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ *L. plantarum* DSM9843 สามารถเพิ่มปริมาณกรดไขมันสายสั้นในกระบวนการหมักในลำไส้ใหญ่ และ *Saccharomyces boulardii* ช่วยป้องกันการเกิดท้องเสีย และยับยั้งการเจริญของ *Clostridium* ในทางเดินอาหาร

1.1 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งจะส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้น ดังนั้นการที่แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเจริญและผ่านลงไป ในลำไส้ใหญ่เพื่อส่งเสริมสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้นได้ ต้องมีคุณสมบัติหลายประการเพื่อสามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในทางเดินอาหารส่วนบนและผ่านลงไปเจริญในลำไส้ใหญ่ได้ ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีต้องมีคุณสมบัติดังนี้

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติก

Table 1. Examples of bacteria used as probiotics.

Lactobacilli species	Bifidobacterium species	Other LAB	Non-lactics
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^a	<i>B. cereus</i> ^{a,d}
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactoc. lactis</i> ^c	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{a,d}
<i>L. gallinarium</i> ^a	<i>B. breve</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> ^c	<i>S. cerevisiae</i> ^{a,d}
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Ped. acidilactici</i> ^c	<i>B. subtilis</i> ^a
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ^b	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Strep. thermophilus</i>	
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

^aMainly used for animals., ^bProbably synonymous with *B. animalis*.

^cLittle known about probiotic properties., ^dMainly as pharmaceutical preparations.

ที่มา: Holzapfel และคณะ (1998)

ตารางที่ 2 ผลของโปรไบโอติกต่อสุขภาพ

Table 2. Effects of probiotics for host health.

Type of bacteria	Health benefit
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Protection diarrhea in infant, increase immune
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (acidophilus) LJ-1(La1)	Increase immune
<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12	Protection diarrhea, increase immune
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Protection diarrhea, inhibited <i>Clostridium</i> in intestine
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM9843(299v)	Increase short chain fatty acid

ที่มา : Saarela และคณะ (2002)

1.1.1 แบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติที่สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เนื่องจากในกระเพาะอาหารจะมีพีเอชในช่วง 1-3 ซึ่งเกิดจากร่างกายมีการหลั่งของกรดไฮโดรคลอริกเพื่อช่วยในการย่อยอาหารทำให้พีเอชในกระเพาะอาหารค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ดีต้องมีความสามารถในการทนต่อพีเอชในช่วงนี้ จึงจะสามารถเหลือรอดไปอาศัยอยู่ในทางเดินอาหารส่วนลำไส้ใหญ่ได้ (Kontula *et al.*, 1998) แบคทีเรียแลคติกที่จัดเป็นโปรไบโอติกมีความสามารถในการทนกรดได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์อย่างเช่น *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 พบว่าสามารถทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) ระดับพีเอชในทางเดินอาหารก็มีผลต่อการเหลือรอดไปถึงลำไส้ใหญ่ พบว่าระดับพีเอชที่เป็นกรดสูงจะส่งผลให้การเหลือรอดไปถึงลำไส้ใหญ่ของแบคทีเรียได้น้อย เช่น แบคทีเรีย *Lactobacillus gassei* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 10, 0.001 และ < 0.001 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 3, 2 และ 1.0 ตามลำดับเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Arihara *et al.*, 1998) และ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกในทางเดินอาหาร สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* (Conway *et al.*, 1987) นอกจากนี้การทนกรดยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่แยกเชื้อ โดย Pennacchia และคณะ (2004) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* จากไส้กรอกหมัก ได้ 155 สายพันธุ์ โดยมีเพียง 28 สายพันธุ์ ที่มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 2.5 เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก 29 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อพีเอช 3 ได้ 6 ชั่วโมง สามารถทนพีเอช 2 ได้ 3 ชั่วโมง 16 สายพันธุ์ และสามารถทนพีเอช 1 ได้ 1 ชั่วโมง (Maragkoudakis *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Jacobsen และคณะ (1999) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกโดยศึกษาในแบคทีเรียแลคติก 44 สายพันธุ์ พบว่ามี 29 สายพันธุ์ที่สามารถทนพีเอช 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้

1.1.2. โปรไบโอติกที่ดีจะต้องสามารถทนต่อเกลือแร่ได้เนื่องจากในทางเดินอาหารส่วนต้น โดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กจะมีเกลือแร่ที่หลังจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเกลือแร่ร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila และ Petaja, 2000) ความสามารถในการทนต่อเกลือแร่จะทำให้โปรไบโอติกสามารถผ่านและเจริญในลำไส้ใหญ่ได้ จากรายงานของ Hyronimus และคณะ (2000) ศึกษาผลของเกลือแร่ต่อการเจริญของ spore-forming lactic acid bacteria ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *B. racemilacticus* และ *B. coagulans* สามารถทนเกลือแร่ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้ Shirota (1962 อ้างโดย Gibson และ Anngus, 2000) ศึกษาการทนต่อเกลือแร่ของโปรไบโอติกที่แยกจากสัตว์น้ำ พบว่า

Lactobacillus สายพันธุ์ที่ทนต่อเกลือได้ดีสูง ได้แก่ *L. bulgaricus*, *L. fermenti*, *L. casei* และ *L. acidophilus* ทนเกลือที่ความเข้มข้น 2, 4, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

1.1.3. สามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะช่วยในการ colonization ของโปรไบโอติกได้ดีขึ้น และยังช่วยให้การย่อยอาหาร และการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

1.1.4. ส่งเสริมเจ้าบ้าน (host) ให้มีสุขภาพที่ดีขึ้น ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกในทางเดินอาหารของมนุษย์นอกจากจะมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กแล้ว ยังมีคุณสมบัติต่อสุขภาพในหลายด้านดังนี้ (ภาพที่ 1)

ก. ป้องกันการเกิด lactose intolerance ซึ่งมีสาเหตุมาจากร่างกายมนุษย์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ lactase มาย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ทำให้เกิดอาการท้องอืดหรือท้องเสียเมื่อกินอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสเข้าไป จะพบมากในผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถไปลดการเกิดท้องอืดและท้องเสียได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ lactase ช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมได้ (Fook *et al.*, 1999)

ข. ปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกาย และป้องกันการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดท้องเสีย ท้องร่วง ซึ่งแบคทีเรียโปรไบโอติกจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดย

- การแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรคในการเข้ายึดเกาะผนังลำไส้ ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเข้ายึดเกาะและเพิ่มจำนวนขึ้นได้ ส่งผลให้จุลินทรีย์ในร่างกายเกิดความสมดุลไม่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ

- แย่งอาหารแบคทีเรียก่อโรค ทำให้แบคทีเรียก่อโรคมีอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต

- สร้างสารยับยั้งขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีมากเกินไป เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Fuller, 1993) Spelhaug และ Harlander (1989) ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* และ *P. pentosaceus* โดยวิธี agar spot พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือ *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringen*, *Staphylococcus aureus* แต่จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น Voughan และคณะ (1994) ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ประมาณ 1,000 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการ

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fragi* และ *Lactobacillus bulgaricus* พบว่าสามารถยับยั้งการแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

ค. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสามารถพบได้ในแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kaila และคณะ (1992) มีการนำ *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่าทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีขึ้นถึงร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับ *Lactobacillus* sp มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46

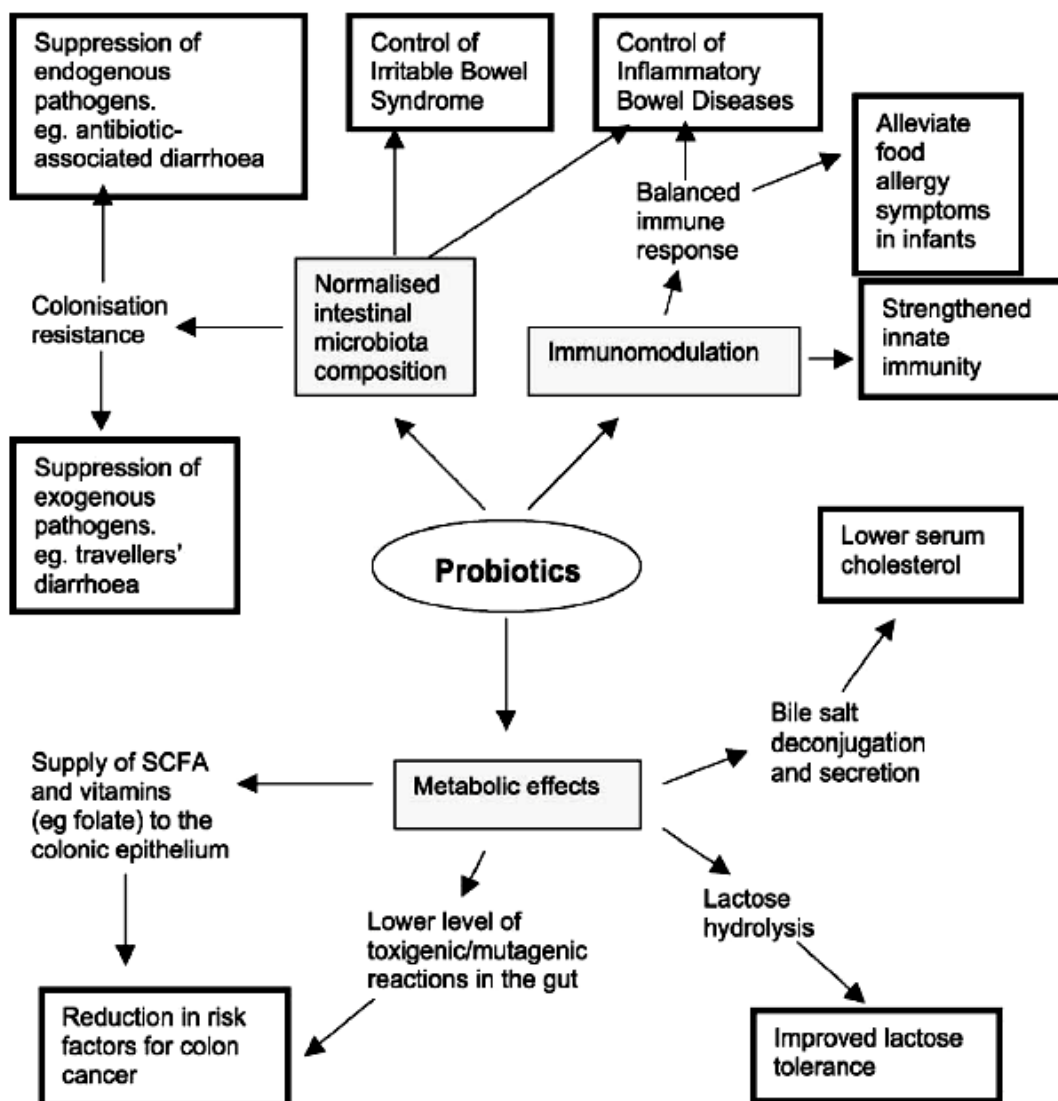
ง. ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) โดยไปลดการผลิตเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β -glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β -glucosidase (Kontula *et al.*, 1998)

จ. ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดยพบว่า *Lactobacillus acidophilus* สายพันธุ์ 016 และ สายพันธุ์ C14 ที่แยกจากอุจจาระของคน สามารถลดคอเลสเตอรอลได้ 50.9 และ 47.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ L1 017 และ C18 สามารถลดคอเลสเตอรอลได้ 46.3, 33.2 และ 29.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Lactobacillus acidophilus* สายพันธุ์ ATCC 43121 ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมสามารถลดคอเลสเตอรอลได้ 42.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Buke and Gilliland, 1994)

1.2 จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มี 2 กลุ่ม ทั้งที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* กับกลุ่มที่ให้โทษต่อร่างกาย เช่น *Clostridia* และ *Staphylococci* (ภาพที่ 2) ซึ่งการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มในทางเดินอาหารนั้นมีผลต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (host) โดยถ้ากลุ่มของจุลินทรีย์ที่ให้โทษมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะทำให้ร่างกายเกิดโรคต่างๆ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง แต่โดยปกติกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยไปแย่งพื้นที่บริเวณผนังลำไส้ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเข้าเกาะ และเพิ่มจำนวนได้ทำให้กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ให้โทษมีปริมาณน้อยไม่สามารถก่อโรคในร่างกาย หรืออาจจะสร้างสารออกมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน นอกจากนี้การเข้าแย่งอาหารกับแบคทีเรียก่อโรคทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ ส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้านดีขึ้นด้วย ในระบบทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota) แตกต่างกันทั้ง

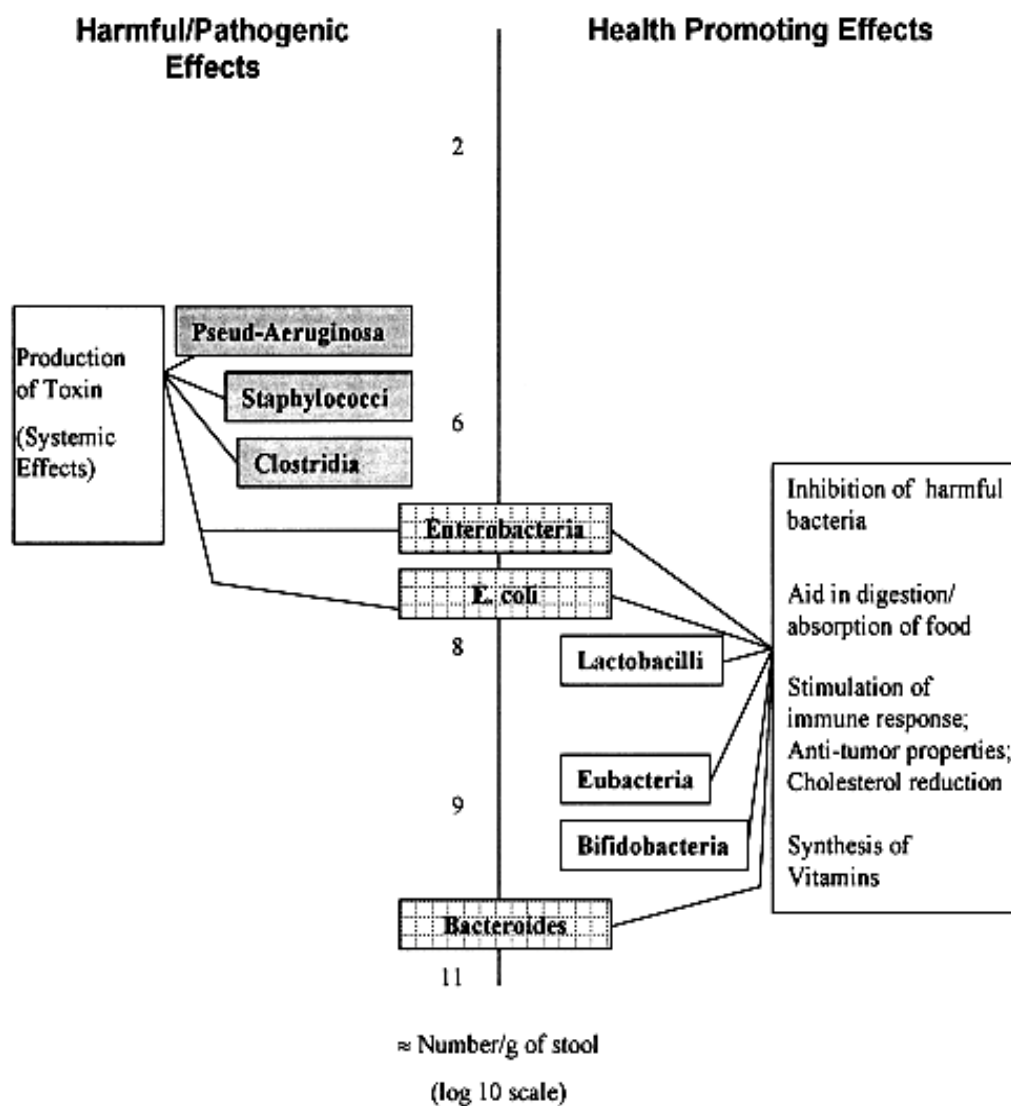
ชนิดและจำนวน (ภาพที่ 3) เริ่มตั้งแต่ในช่องปาก ซึ่งมักพบจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็น facultative และ strictly anaerobes ซึ่งเป็นพวก *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* และยีสต์ (Saarela *et al.*, 2002) ในกระเพาะอาหารมักเป็นพวก *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Helicobacter pylori* และ *Candida albicans* จะมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ 10^4 CFU ต่อกรัม โดยในลำไส้เล็กแต่ละส่วนจะมี



ภาพที่ 1 ประโยชน์ของการบริโภคแบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีต่อสุขภาพของผู้บริโภค

Figure 1. Proposed health benefits stemming from probiotic consumption.

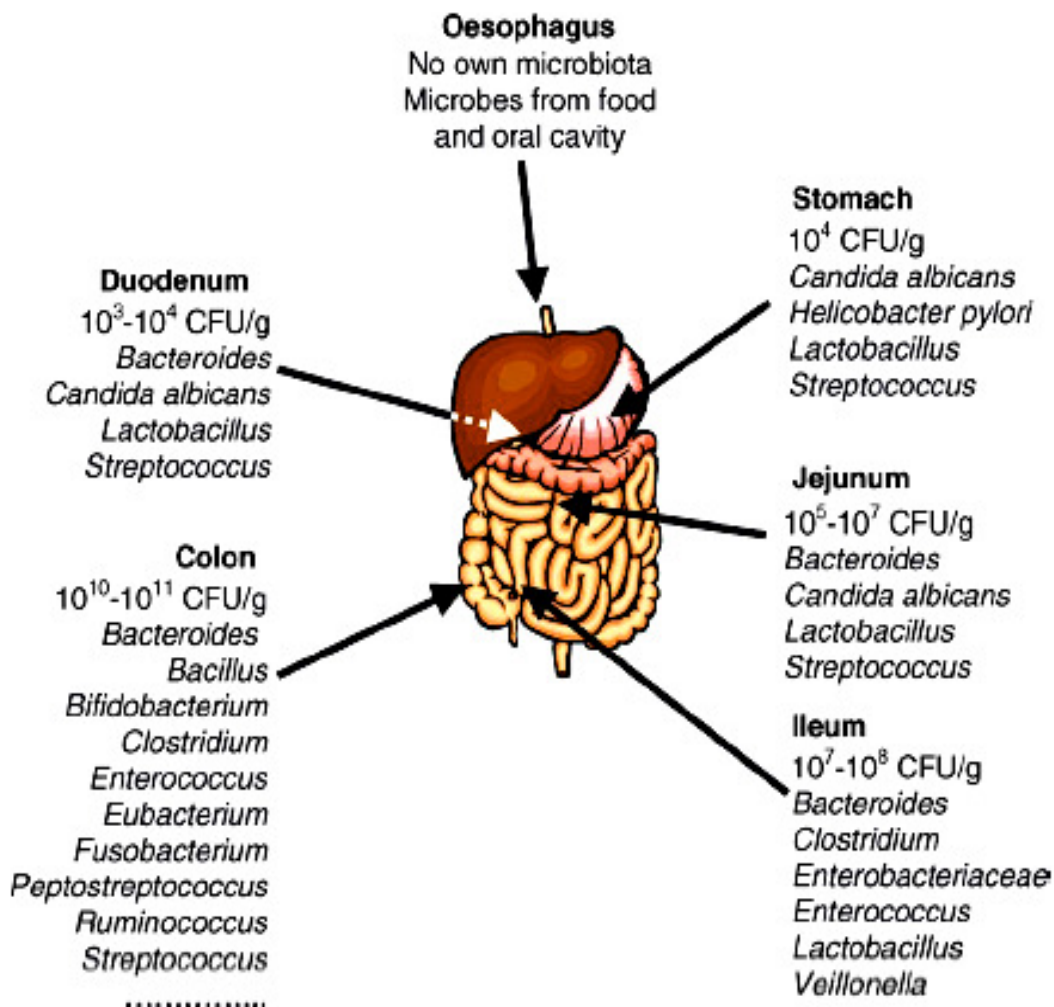
ที่มา: Saarela และคณะ (2002)



ภาพที่ 2 แสดงกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และให้โทษต่อร่างกาย

Figure 2. Dichotomy of microflora based on potentially toxic and beneficial properties.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Walker และ Duffy (1998)



ภาพที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

Figure3. The numerically dominant microbial genera in the human gastrointestinal tracts.

ที่มา : Isolauri และคณะ (2004)

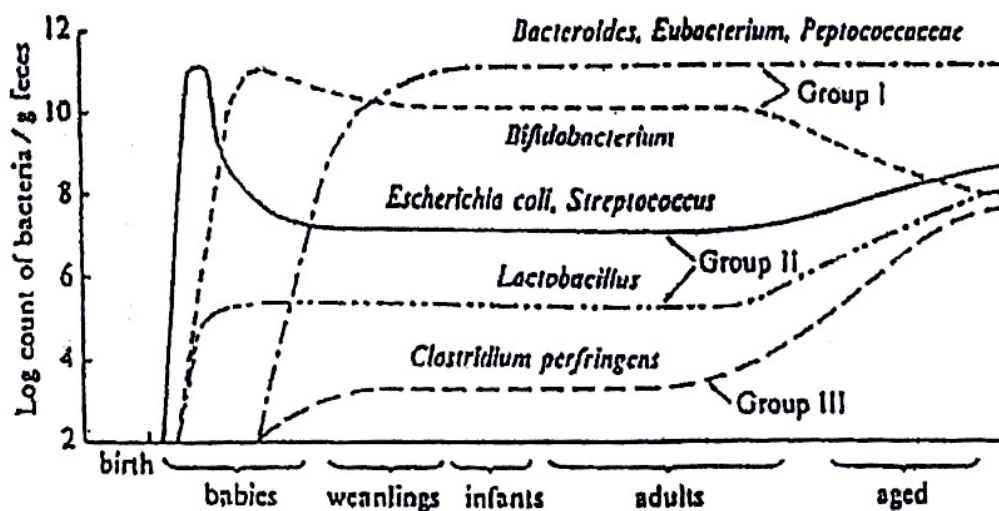
จำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน พบว่าบริเวณคูโอดินัม (duodenum) มีประมาณ 10^3 - 10^4 CFU ต่อกรัม ส่วนเจจูนัม (jejunum) มีประมาณ 10^5 - 10^7 CFU ต่อกรัม และบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) พบในจำนวน 10^7 - 10^8 CFU ต่อกรัม และในส่วนของลำไส้ใหญ่จะมีจำนวนของจุลินทรีย์หนาแน่นที่สุด คือประมาณ 10^{10} - 10^{11} CFU ต่อกรัม (Isolauri *et al.*, 2004) นอกจากอวัยวะส่วนต่างๆ ในทางอาหารแล้ว ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นยังแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง ดังนี้

1.2.1 อายุของเจ้าบ้าน (host) เด็กทารกหลังคลอดสามารถพบ normal flora ที่บริเวณผิวหนัง และในทางเดินอาหาร เช่น *Staphylococcus*, *Corynebacterium* และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* และ *Streptococcus* จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่อนข้างคงที่เมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ เมื่ออายุเข้าสู่วัยชราแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria จะลดลง ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium*, *Lactobacillus*, *E. coli* และ *Streptococcus* จะเพิ่มขึ้น และแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides* และ *Eubacterium* จะมีปริมาณคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4 (Gibson and Angus, 2000)

1.2.2. สภาวะแวดล้อมในทางเดินอาหาร เช่น ปริมาณออกซิเจน ในทางเดินอาหารแต่ละส่วนมีปริมาณออกซิเจนที่แตกต่างกัน บริเวณปากจะมีปริมาณออกซิเจนมากกว่าส่วนกระเพาะอาหารและบริเวณลำไส้ ส่งผลให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บริเวณนี้จะเป็นกลุ่มที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) แต่แบคทีเรียกลุ่มที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ไม่สามารถเจริญโดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Clostridium* ในทางเดินอาหารบริเวณลำไส้จะมีปริมาณออกซิเจนน้อยมาก โดยเฉพาะลำไส้ใหญ่เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe condition) ทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* และ *Eubacteria* มีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ต้องการออกซิเจน นอกจากนี้สภาวะความเป็นกรดที่สูงในกระเพาะอาหาร และระดับความเข้มข้นของเกลือแร่ในลำไส้เล็ก ยังส่งผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด และเกลือแร่ได้นั้นจะสามารถผ่านลงไปในส่วนของลำไส้ใหญ่ ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก เช่น *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในร่างกายส่งผลให้ปริมาณของแบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เช่น *E. coli* และ *S. aureus*

1.2.3. อาหาร ชนิดของสารอาหารที่บริโภคเข้าสู่ร่างกายมีผลต่อการกำหนดชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เจริญในทางเดินอาหาร โดยทารกที่ดื่มนมมารดาจะมีปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria อยู่มากกว่าทารกที่ดื่มนมผงซึ่งส่งผลให้ทารกกลุ่มนี้มีภูมิคุ้มกันที่ดี สามารถต้านทานต่อแบคทีเรียก่อโรค อีกทั้งพบจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่น clostridia ลดลง (Hughes and Hoover, 1991; Beerens *et al.*, 1980) เนื่องจากในน้ำนมแม่มีองค์ประกอบของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ชนิดกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galactooligosaccharides) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกคือสามารถกระตุ้นการเจริญอย่างจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria (Beerens *et al.*, 1980) โดยการหมักสารพรีไบโอติกของจุลินทรีย์กลุ่มโปรไบโอติกจะช่วยในการ ดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้น ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีส่วนผสมของสารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เช่น ในเครื่องดื่ม และนมหมัก เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ รัญพืช ขนบปังกกรอบ ผลิตภัณฑ์นมเด็ก เป็นต้น

จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสามารถใช้สารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่ได้ จัดเป็นกลุ่ม saccharolytic bacteria ที่สามารถหมักสารอาหารกลุ่มแซคคาไรด์ (saccharides) เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้เป็นกรดอินทรีย์ จุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ Bifidobacteria และกลุ่ม Lactobacilli นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ที่เป็นกลุ่ม proteolytic bacteria ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถใช้สารอาหารกลุ่มโปรตีนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จุลินทรีย์ที่หมักแบบนี้ เช่น Clostridia และ Bacteriodes ดังนั้นประเภทของอาหารที่มนุษย์บริโภคนั้น นอกจากจะมีผลต่อร่างกายโดยตรงในเชิงคุณค่าทางโภชนาการแล้วยังส่งผลต่อประเภทของจุลินทรีย์ที่เจริญในทางเดินอาหารด้วย ดังนั้นการเลือกรับประทานอาหารจึงมีผลอย่างมากต่อสุขภาพทั้งในทางตรง และทางอ้อม



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในวัยต่างๆ

Figure 4. Changes in the colonic microflora with increasing age.

ที่มา : Gibson และ Angus (2000)

1.3 บทบาทและการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่

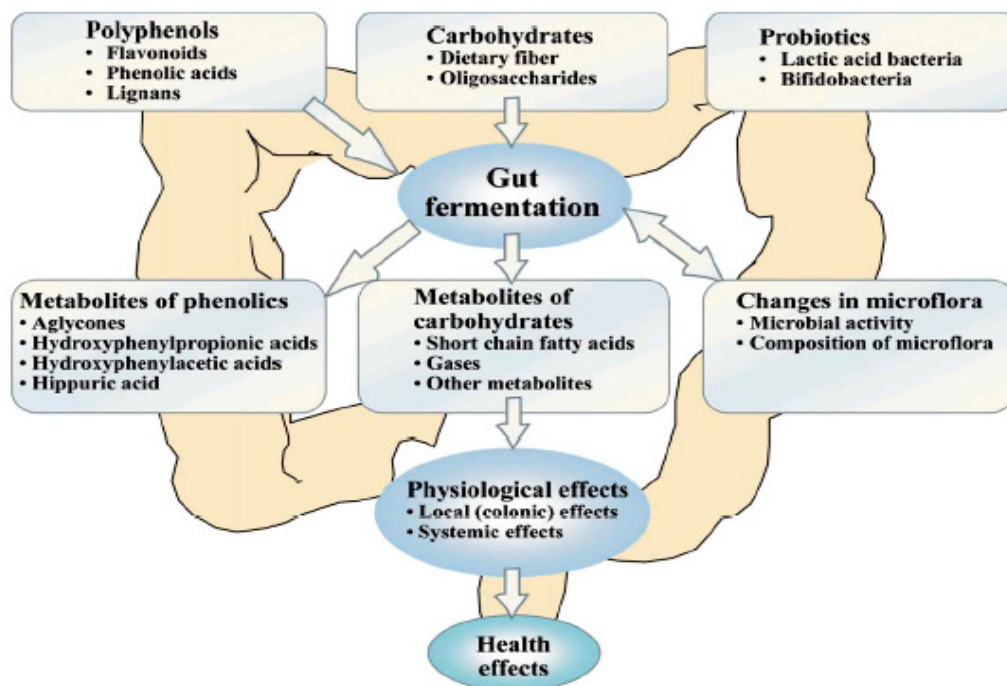
ภายในลำไส้ใหญ่จะมีกระบวนการหมัก และการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารที่เหลือจากการย่อย และการดูดซึมที่กระเพาะและลำไส้เล็กโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่แสดงดังภาพที่ 9 ซึ่งการหมักจะเกิดแบบสภาวะไร้อากาศ (Wolowski *et al.*, 2001) กระบวนการหมักในลำไส้ใหญ่จะเกิดขึ้น 2 แบบ

1.3.1 การหมักแบบ saccharolytic

เป็นการหมักสารอาหารกลุ่ม saccharides จะเกิดบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนต้น เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ที่เกิดการหมักสารกลุ่มนี้ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ผลิตกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนต และ บิวเทอเรท และยังมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ มีเทน เกิดขึ้นด้วย (Cumming and Macfarlane, 1991) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นจะถูกนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ภายในร่างกาย อะซิเตทจะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ โพรพิโอเนตจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ส่วนบิวเทอเรท จะใช้ในการแบ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่ และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย การหมักแบบ saccharolytic ในลำไส้ใหญ่มีผลให้ปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น เพิ่มความนุ่มให้อุจจาระ และช่วยในการสังเคราะห์วิตามิน เช่น วิตามินบี (Tannock, 1995 อ้างโดย Blaut, 2002) การหมักแบบนี้จะเกิดบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ซึ่งเป็นการหมักอาหารที่มีองค์ประกอบเป็นเส้นใย เช่น ผัก ผลไม้ และ ธัญพืช จุลินทรีย์จะสามารถนำสารดังกล่าวไปใช้ได้แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมี/ฟิสิกส์ ขนาดของเส้นใยและความสามารถในการละลายซึ่งสารที่สามารถละลายได้ดีจะถูกจุลินทรีย์นำไปใช้ได้ดีกว่าสารที่ละลายได้น้อย ทั้งนี้เนื่องจากการละลายของสารเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการสัมผัสกับเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ดีขึ้น

1.3.2 การหมักแบบ proteolytic

เป็นการหมักสารอาหารกลุ่มโปรตีน โดยจุลินทรีย์ที่หมักสารอาหารกลุ่มนี้ เช่น Clostridia ซึ่งผลิตกรดไขมันสายสั้นได้สารกลุ่ม เอมีน (amine), อินโดล (indole) และ แอมโมเนีย ซึ่งสารเหล่านี้จะให้ผลด้านลบต่อร่างกาย เช่น เป็นสารก่อมะเร็ง (Gibson, 2004) การหมักแบบนี้จะเกิดบริเวณลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย



ภาพที่ 9 กระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่

Figure 9. Fermentation of large intestine.

ที่มา: Puupponen-Pimia และคณะ (2002)

1.4 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะตอะเลส ไม่มีระบบไซโตโครม (cytochrome) ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ในการเจริญ บางชนิดไม่ต้องการอากาศ อุณหภูมิที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอช ≤ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993) แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม อาหารหมัก เนื้อสัตว์ ผักสด ผลไม้ เครื่องดื่ม นอกจากนี้แล้วยังสามารถพบแบคทีเรียแลคติกได้ในร่างกายมนุษย์และสัตว์ด้วย บริเวณที่สามารถพบแบคทีเรียแลคติกได้ในร่างกายเช่น ทางเดินอาหาร (gastro-intestinal tract) และอวัยวะสืบพันธุ์ เป็นต้น

แบคทีเรียหลายสกุล (genus) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Oneococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus* (Axelsson, 1993) หากแบ่งชนิดของแบคทีเรียแลคติกตามความสามารถในการสร้างกรด และผลิตภัณฑ์ สามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้

1.4.1. โฮโมเฟอร์เมนเตฟเป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas pathway: EMP pathways ให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว (Wistereich, 1997) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณร้อยละ 80 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ไม่ต้องการไนโตรเจนในการเจริญเติบโต เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส หรือ 15 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์อัลโคเลสแต่ไม่สร้างเอนไซม์ฟอสโฟลิโคเลส แบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus sake*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus* sp. และ *Pediococcus pentosaceus*

1.4.2. เฮเทอโรโรเฟอร์เมนเตฟ เป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Pentose phosphoketolase pathways ให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Wistereich, 1997) จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ต้องการใช้นิโตรเจนในการเจริญเติบโต และสร้างเอนไซม์ฟอสโฟลิโคเลสแต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโคเลส แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *Bifidobacterium* และ *L. brevis*

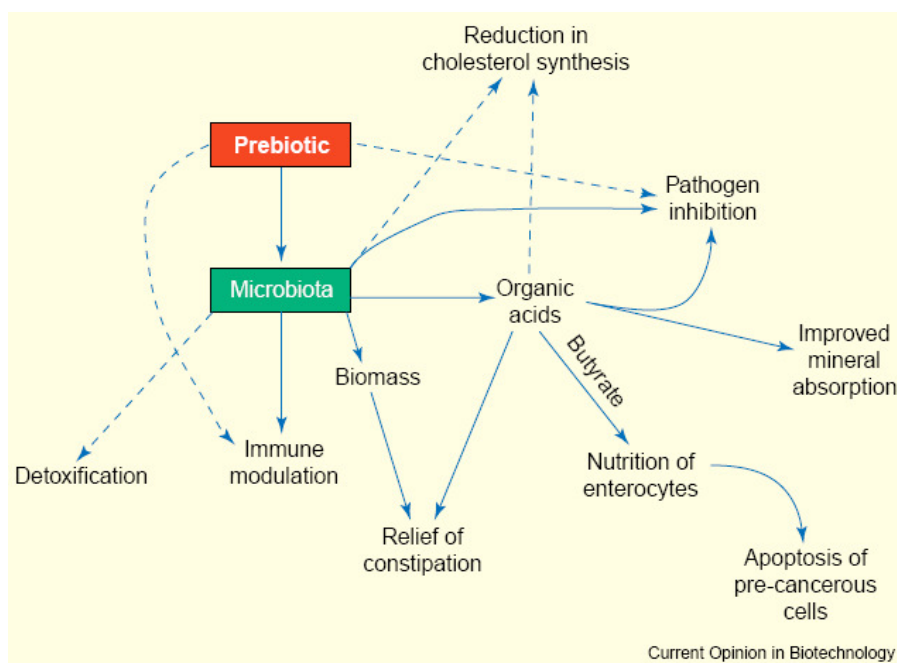
2. 프리ไบโอติก (Prebiotics)

2.1 ความหมายและคุณสมบัติของ 프리ไบโอติก

ฟรีไบโอติก เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน แต่แบคทีเรียบางกลุ่มโดยเฉพาะกลุ่มที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้สารอาหารเหล่านั้น ในการเจริญและส่งผลโดยรวมต่อการเสริมสร้างสุขภาพของเจ้าบ้านให้ดีขึ้นเช่น *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* (Cummings et al., 2001) สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นฟรีไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องสามารถลงไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน (Gibson, 2004; Fooks et al., 1999; Kolida et al., 2002) และเป็นสารอาหารที่เสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่อาศัยในลำไส้ใหญ่ได้อย่างจำเพาะโดยเฉพาะกลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* (Gibson, 2004; Kolida et al., 2002) นอกจากนี้สารอาหารที่จัดเป็นฟรีไบโอติกจะต้องไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens* (Gibson et al., 1995; Gibson and Roberfroid, 1995; Kolida et al., 2002)

ดังนั้นสารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร และลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีเปลี่ยนแปลง และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004) และส่งผลให้สุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez *et al.*, 2000; Van *et al.*, 1998) ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ดังแสดงในภาพที่ 5

สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่รู้จักกันดีมักเป็นสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เช่น แลคตูโลส (lactulose) แรฟฟิโนส (raffinose) สตาคีโอส (stachyose) และ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เป็นพวก resistant starch (RS), Non-starch polysaccharide (NSP) รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพนคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไชแลน และนอกจากนี้ mucine glycoprotein ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่และโคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แบคทีเรียพรีไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน โดยจากการศึกษาพบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3440, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3249 และ *Lactobacillus* sp. ได้ (Lee *et al.*, 2002)



ภาพที่ 5 กลไกของพรีไบโอติก ที่มีผลต่อสุขภาพ

Figure 5. The possible mechanisms of prebiotic action.

ที่มา : Ouwehand และคณะ (2005)

2.1 ชนิดของสารพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่มีการผลิตขายทางการค้าและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่เป็นพวกโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อย 2-20 มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) ที่เรียกว่า พันธะไกลโคซิดิก (ตารางที่ 3) โดยสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก อาจพบในอาหารที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งเป็นอาหารที่บริโภคอยู่เป็นประจำ อย่างเช่นในผักและผลไม้ เช่น หอม กระเทียม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช อย่างไรก็ตามสารประกอบ โอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ผลิตเพื่อจำหน่ายทางการค้า เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ โดยใช้น้ำตาล แป้ง หรือ อินนูลิน เป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์ ประเภทต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์

ตารางที่ 3 โครงสร้างของสารพรีไบโอติกที่มีทางการค้า

Table 3. Structure of commercial available prebiotic oligosaccharides.

Oligosaccharides	Structure
Lactulose	Gal β 1-4Fru
Fructo-oligosaccharides	Fru β 2-1Fru _n , n=1-3 Glu α 1-2[β Fru1-2] _n , n=2-9
Inulin, Raftiline LS	Fru β 2-1Fru _n , n=1->60 Glu α 1-2[β Fru1-2] _n , n>10
Galacto-oligosaccharides, GOS	Glu α 1-4[β Gal1-6] _n , n=1-4
Soybean oligosaccharide, SOS	Raffinose(Gal α 1-6Glu1-2 β Fru) Stachyose(Gal α 1-6 Gal α 1-6 Glu α 1-2 β Fru)
Lactosucrose	Gal β 1-4 Glu α 1-4 Glu α 1-2 β Fru
Isomalto-oligosaccharide, IMO	Glc α 1-6[Glu α 1-6] _n , n \geq 1
Xylo-oligosaccharides	Xyl β 1-4[Xyl] _n , n=2-7

ที่มา: Rastall และ Gibson (2002)

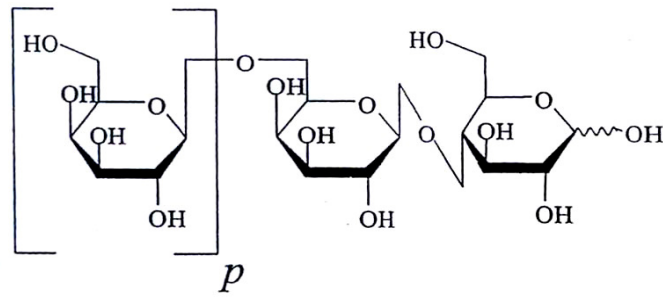
2.1.1 ฟรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

2.1.1.1 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโครงสร้างเป็น $\text{Glu}\alpha\text{1-4}[\beta\text{ Gal 1-6}]_n$, $n=2-5$ ดังแสดงในภาพที่ 6 พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแลคโตส โดยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharide) จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยและดูดซึม และถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวเทอเรท และมีก้าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli ทั้งในการศึกษา *in vitro* และ *in vivo* โดยจากการศึกษาของ Tzortzis และคณะ (2004) พบว่ากาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการผลิตโดยเอนไซม์ แอลฟา กาแลคโตซิเดส (α -galactosidase) สามารถเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ได้ โดยทำการเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ในอาหาร minimal medium ใช้ faecal เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชอยู่ที่ 6.8 โดยเปรียบเทียบกับ FOS, melibiose และ raffinose ซึ่งเป็นฟรีไบโอติกทางการค้า เมื่อทำการหมักไป 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ *Bifibacterium* และ *L. acidophilus* ได้สูงกว่าฟรีไบโอติกทางการค้า และสามารถไปลดปริมาณของ clostridia ได้สูงเท่าฟรีไบโอติกทางการค้า

นอกจากนี้ในการศึกษาในระดับ *in vivo* ทั้งในคนและสัตว์ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน โดย Ito และคณะ(1990 อ้างโดย Sofia และคณะ, 2001) ได้ให้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์แก่อาสาสมัคร 12 คน ที่มีจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่ำกว่าปกติ บริโภคในปริมาณ 10 กรัมต่อวันพบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพิ่มขึ้น เมื่ออาสาสมัครได้รับปริมาณกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ นอกจากนี้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีผลต่อการเพิ่มการดูดซับแคลเซียมในหนูที่รับอาหารที่มีส่วนผสมของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นเวลา 30 วัน โดยพบว่าหนูที่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีการดูดซับแคลเซียม ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Chonan *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yanahira (1997) ที่พบว่าหนูที่ได้รับ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 14 วัน มีการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียมได้เพิ่มขึ้นสูงกว่าหนูที่ไม่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์



ภาพที่ 6 โครงสร้างของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide) p=1-6

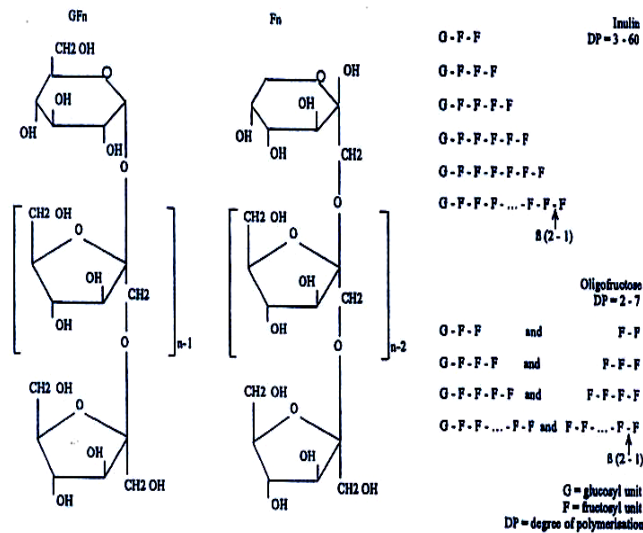
Figure 6. Structure of galactooligosaccharides.

ที่มา : Gibson และ Angus (2000)

2.1.1.2 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosacchrides, FOS) และ อินนูลิน

(Inulin)

อินนูลินเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีฟรุคโตส (fructose) 3-60 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ $\alpha,1-2$ และ $\beta, 2-1$ โครงสร้างประกอบด้วย $Gluc\alpha 1-2[\beta Fru(2-1)]_n n=10$ และ $Fru\beta 2-1Fru_n$ ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของอินนูลิน (Inulin) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosacchride)

Figure 7. Chemical structure of inulin and fructooligosacchrides.

ที่มา: Gibson และ Angus (2000)

อินนูลินพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรีย และรยางค์ชนิด โดยเฉพาะผักและผลไม้มากกว่า 3,600 ชนิด ส่วนใหญ่จะพบในผักตระกูล chichorium เช่น ชิคอร์รี (chicory) และพืชในตระกูลหอม เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม เป็นต้น (Bxcommerce, 2001) ดังแสดงในตารางที่ 4 อินนูลิน (Inulin) ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ อินนูลิน (Inulin) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosacchride) สามารถละลายน้ำได้ดี โดยเฉพาะในน้ำร้อน (Tanya, 2002) อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kim and Wang, 2002) แต่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็น และแอลกอฮอล์ (Paul, 1997) และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทสัมผัส รสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่างๆ เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสดและความชื้นในเค้ก ช่วยให้เครื่องดื่มละลายเข้ากันดี มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional property)

นอกจากอินนูลินถูกจัดเป็นเส้นใยอาหารแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกด้วยเนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้อย่างจำเพาะ โดยพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับอินนูลิน 15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ Bifidobacteria และ Lactobacilli เพิ่มขึ้น 10 เปอร์เซ็นต์ และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลง (Paul, 1997) และจากการให้อาสาสมัคร 100 คน รับประทานอินนูลิน (Inulin) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosacchride) ในปริมาณ 5-20 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น และยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม (Van den Heuvel *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1995) อีกทั้งยังพบว่าการดูดซึมแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียมและแมกนีเซียม ได้เพิ่มขึ้นเมื่อหนูได้รับอินนูลินและ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Delzenne *et al.*, 1995) และจากการศึกษาในระดับ in vitro พบว่าสารสกัดฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จาก Yacon Roots สามารถเสริมการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* NRRL-1910, *Lactobacillus plantarum* NRRLB-4496 และ *B. bifidum* ATCC 15696 ได้ และสามารถเสริมการเจริญ *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696 ได้ดีที่สุด (Pedreschi *et al.*, 2003)

2.1.1.3 โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharide, SOS)

โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม แรฟฟิโนส (Raffinose) และ สตาคีโอส (Stachyose) (Gibson, 2004) เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และเหลือตกลงไปถึงลำไส้ใหญ่ ถูกจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่นำไปใช้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ซึ่งจากการศึกษาพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharide) ส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria มีการเจริญเพิ่มขึ้น ส่วนการศึกษาในอาสาสมัครเพศชาย 6 คน ที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง เป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้จำเพาะ (Wada *et al.*, 1992) และเมื่อศึกษาผลของ แรฟฟิโนส

โดยมีการให้แรฟไฟโนสในปริมาณ 15 กรัมต่อวัน พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า อีกทั้งสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp. ได้ 0.6 เท่า และจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* spp. ได้ 1.6 เท่า (Kawaze *et al.*, 1981) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saito และคณะ (1992) พบว่า SOS สามารถเพิ่มแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria ได้ 3 เท่า นอกจากนี้ Izumi และคณะ (2000) อ้างโดย Gibson, 2004) พบว่าการให้ soygerm powder ปริมาณ 4 กรัมต่อวัน จะช่วยเพิ่มความต้านทานต่อเกลือน้ำดี (bile salts) ของ *Lactobacillus reuteri* ได้

ตารางที่ 4 ปริมาณของ Fructo-oligosacchride และ Inulin ในพืช

Table 4. Amount of fructooligosaccharide and inulin in plant.

Sources	Inulin content (% on fresh weight)	FOS (% on fresh weight)
Onion	2-6	2-6
Jerusalem artichoke	16-20	10-15
Chicory	15-20	5-10
Leek	3-10	2-5
Garlic	9-16	3-6
Artichoke	3-10	<1
Banana	0.3-0.7	0.3-0.7
Rye	0.5-1.0	0.5-1.0
Barley	0.5-1.5	0.5-1.5
Dandelion	12-15	NA
Burdock	3.5-4.0	NA
Camas	12-22	NA
Murnong	8-13	NA
Yacon	3-19	3-19
Salsify	4-11	4-11
Wheat	1-4	1-4
Asparagus	1-30	5-10

ที่มา : Van Loo และคณะ (1995)

2.1.1.4 โอลิโกแซคคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ

โอลิโกแซคคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ เส้นใยอาหารเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่เอ็นไซม์ในร่างกายไม่สามารถย่อยได้ เส้นใยอาหารไม่มีสารอาหาร และไม่ให้พลังงาน แต่มีบทบาทสำคัญต่อภาวะโภชนาการและสุขภาพของมนุษย์ เส้นใยอาหารเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ไม่ใช่แป้ง เป็นส่วนประกอบของพืชผักและผลไม้ที่รับประทานได้ แต่ไม่ถูกย่อยโดยน้ำย่อยในระบบย่อยอาหาร เมื่อผ่านลำไส้ใหญ่จะมีบางส่วนถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ สามารถพบได้ในพืชจำพวก ข้าวโอ๊ต ถั่วเมล็ดแห้ง ข้าวบาร์เลย์ แอปเปิ้ล ขนมะพร้าวที่ทำจากข้าวโอ๊ต ผักใบเขียว และผลไม้เกือบทุกชนิดจัดเป็นแหล่งอาหารที่ดีของเส้นใยอาหาร โดยเฉพาะพวกเส้นใยอาหารกลุ่ม cellulose, pectin และ hemicelluloses ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถที่จะหมักเส้นใยอาหารกลุ่มนี้ได้ มีผลให้มวลชีวภาพของแบคทีเรีย (bacterial biomass) เพิ่มขึ้น สารประกอบกลุ่มนี้ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เกิดการหมักแบบ saccharolytic และช่วยเพิ่มความนุ่มให้กับอุจจาระ (Gibson, 2004) พบว่าจากการศึกษาการหมักสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตจากพืช 3 ชนิด คือ มันฝรั่ง ถั่ว (lentil) และ cocoyam ด้วย human faecal bacteria ซึ่งก่อนที่จะทำการหมักนั้นนำสารที่สกัดมาทำการย่อยเบื้องต้นก่อนโดยย่อยด้วยกรดและย่อยด้วยเอ็นไซม์ผสมระหว่าง porcine α -amylase, amyloglucosidase และ invertase จากนั้นนำ สารสกัดที่ไม่ถูกย่อยในขั้นต้นไปศึกษาการหมักพบว่ามีการผลิตกรดไขมันสายสั้น 10 มิลลิโมลต่อกรัม (Laurentin and Edwards, 2004) ในการศึกษาการหมัก sugar beet arabinan และ arabinan oligosaccharides โดยจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของแบคทีเรีย Bifidobacteria ได้ และส่งผลให้ปริมาณของแบคทีเรีย Clostridia ลดลง (Al-Tamimi *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เป็นพวก resistant starch (RS), Non-starch polysaccharide (NSP) รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไซแลน ไคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน โดยจากการศึกษาพบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3440, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3249 และ *Lactobacillus* sp. ได้ (Lee *et al.*, 2002)

2.1.2 พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

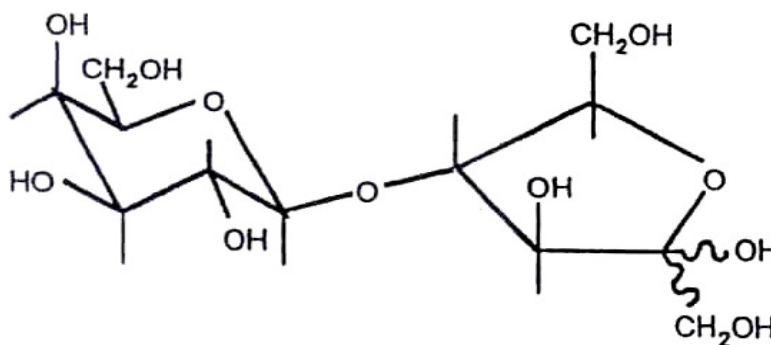
2.1.2.1 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครส ผลิตมาจากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นของน้ำตาลแลคโตสและซูโครส โดยใช้เอ็นไซม์เบต้าฟรุคโตฟูโรซิเดส (β -fructofuranosidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีคุณสมบัติไปเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria โดยพบว่าการให้แลคโตซูโครส ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน กับอาสาสมัคร 3 คน สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ 0.7 เท่า

และลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteriodes* ได้ 0.6 เท่า และยังส่งผลให้มีการผลิตกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท และ บิวเทอเรท เพิ่มขึ้นด้วย (Ohkusa *et al.*, 1995)

2.1.2.2 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส เป็นไดแซคคาไรด์ (disaccharides) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกาแลคโตสและฟรุกโตสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 glycosidic linkage แสดงดังภาพที่ 8 ซึ่งผลิตโดยใช้ catalytic isomerzation ของน้ำตาลแลคโตส มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อย และไม่ละลายในอีเทอร์ ซึ่งแลคทูโลส จะไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ และมีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้เพิ่มขึ้น จากการศึกษาคผลของแลคทูโลสต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยให้แลคทูโลส 3 กรัมต่อวัน ในอาสาสมัคร 8 คน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้น และแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น Clostridia, *Bacteriodes* และ Streptococci ลดลง นอกจากนี้ (Terada *et al.*, 1993) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ballongue และคณะ (1997) ได้ศึกษาโดยการให้แลคทูโลส 10 กรัมต่อวัน ในอาสาสมัคร 2 คนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli เพิ่มขึ้น โดยปกติแลคทูโลสจะไม่มีอยู่ในอาหารทั่วไปหรืออาจมีน้อยมากจึงมีการนำแลคทูโลสไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น โยเกิร์ต คุกกี้ เค้ก และช็อกโกแลต เป็นต้น



ภาพที่ 8 โครงสร้างของแลคทูโลส (Lactulose)

Figure 8. Structure of lactulose.

ที่มา : Gibson และ Angus (2000)

2.1.2.3 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α ,1-6 glycosidic linkage ถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ 2 ชั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการย่อยแป้งโดยเอนไซม์ α -amylase และ pullulanase ร่วมกัน ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α ,1-4 glycosidic linkage จากนั้นเอนไซม์ α -glucosidase เปลี่ยนเป็นพันธะ α ,1-6 glycosidic linkage ซึ่งบางส่วนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กได้เป็นไอโซมอลโตส (Kolida *et al.*, 2000) จากการศึกษพบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* พบว่าเมื่อศึกษาการเสริมการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยใช้ระบบ Human colonic-batch culture ซึ่งมีการเติม IMO ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนของ bifidobacteria ได้ และปริมาณ clostridia ลดลง (Rycroft *et al.*, 2001) และพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ (oligodextrins) สามารถเสริมการเจริญของ bifidobacteria และ lactobacilli ได้ เมื่อเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณ clostridia, eubacteria และ bacteriodes ลดลงในชั่วโมงที่ 48 (Santad Wichienchot, 2005) นอกจากนี้เมื่อให้ IMO แก่อาสาสมัครผู้ชาย 6 คนที่มีสุขภาพแข็งแรงในปริมาณ 20 กรัมต่อวันพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และสามารถเสริมการผลิตบิวเทอเรท (butyrate) เพิ่มขึ้น (Olano-Martin *et al.*, 2000)

2.1.2.4 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharides, GOS)

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ β ,1-6 glycosidic linkages สังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจสกัดมาจาก β -glucan จากต้นโอ๊ก GOS สามารถถูกนำไปใช้ด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งจากการให้กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์แก่หนู สามารถเสริมการเจริญของ *Bifidobacteria breve* และสามารถลดการปนเปื้อนของ *Salmonella* ได้ (Asahara *et al.*, 2001) นอกจากนี้เมื่อศึกษาผลของการหมัก Oligodextran โดยใช้ Human colonic-gut model ซึ่งมีการเติม Oligodextran ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการหมัก 21 วัน พบว่าจำนวนของ Bifidobacteria และ Lactobacilli เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเสริมการผลิตบิวเทอเรท (butyrate) เพิ่มขึ้นถึง 21.70 มิลลิโมลต่อลิตร (Olano-Martin *et al.*, 2000)

2.1.2.5 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β ,1-4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยและถูกนำไปใช้ได้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ lactobacilli ได้อย่างจำเพาะทำให้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* ลดลง อีกทั้ง

สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้มากกว่าการใช้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Gibson and Angus, 2000; Gibson, 2004)

3. บทบาทและความสำคัญของพรีไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกไม่ได้ไปมีผลโดยตรงต่อสุขภาพแต่จะใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่ โดยไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้พรีไบโอติก และผลิตสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกัน สารประกอบที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจากการย่อยและหมักพรีไบโอติกได้แก่ กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) สารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ SCFA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ จะมีปริมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ (กรัม SCFA/100 กรัมสับสเตรท) ในแต่ละวันจะผลิตออกมาประมาณ 300-500 มิลลิโมล ประกอบไปด้วย อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวเทอเรท (Cummings and Englyst, 1995) ปริมาณของ SCFA จะมีปริมาณสูงสุดในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม (caecum) และส่วนต้น และมีปริมาณลดลงในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ดังตารางที่ 5 ซึ่งกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิดจะมีบทบาทการทำงานที่แตกต่างกัน อะซิเตทจะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ ไขมัน และหัวใจ โพรพิโอเนทจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP และมีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ส่วนบิวเทอเรทจะใช้ในการแบ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่ กรดไขมันสายสั้น สามารถควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cellular proliferation) และการตายของเซลล์ (program cell death) โดยทำการศึกษาทั้งในห้องทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) (Johnson, 2002) แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ดังนั้นบทบาทของพรีไบโอติกต่อสุขภาพของผู้บริโภคมีดังนี้

3.1 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกสามารถไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (pathogens) โดยไปกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ให้มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้น เช่น กรดไขมันสายสั้น ซึ่งมีผลให้พีเอชในลำไส้ลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ยังทำให้โปรไบโอติกมีการผลิต antibiotics และ antimicrobials สูงขึ้น โดยจากการศึกษาผลของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ และ อินนูลินในหนูพบว่าหนูที่ได้รับสารเหล่านี้สามารถป้องกันการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้ และสามารถป้องกันการเกิดเนื้องอกได้ด้วย (Buddington *et al.*, 2002 อ้างโดย Gibson, 2004)

ตารางที่ 5 ปริมาณของกรดไขมันสายสั้นที่ถูกผลิตในลำไส้ส่วนต่างๆ เมื่อมีการเติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน

Table 5. Total SCFA in regions of the large bowel fed various carbohydrates sources.

Study	Carbohydrate Source	Fiber (g/day)	Cecum	Proximal colon (mmol/kg content)	Mid colon (mmol/kg content)	Distal colon (mmol/kg content)
Bach-Knudsen <i>et al.</i> (1991)	Wheat flour	62	100	90	60	60
Glitso <i>et al.</i> (1998)	Whole rye	156	156	123	70	54
	Rye pericarp	177	112	107	77	70
	Rye aleurone	180	164	160	122	74
	Rye endosperm	94	151	104	82	57
Marsono <i>et al.</i> (1993)	White rice	20	82	78	36	25
	Brown rice	37	72	96	87	65
Topping <i>et al.</i> (1993)	Wheat bran	44	131	94	85	52
	Beans	45	124	139	80	65
	Oat bran	42	92	97	73	39

ที่มา: Topping และ Clifton (2001)

3.2 การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

ลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งของสะสมของเสีย และเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด ดังนั้นมีโอกาสการเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ได้มากกว่าในทางเดินอาหารส่วนอื่น พบว่าบริเวณลำไส้ใหญ่มีโอกาสต่อการเป็นมะเร็งมากกว่าลำไส้เล็กถึง 100 เท่า ซึ่งมีการศึกษาพบว่า สารพรีไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Rowland and Tanaka, 1993; Reddy *et al.*, 1997; Bouhnh *et al.*, 1997; Buddington *et al.*, 1996; Hylla *et al.*, 1998) การหมักสารพรีไบโอติกของแบคทีเรียหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ โดยการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ให้เป็นไปในแนวทางที่จะลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเกิดเมแทบอลิซึมของไขมัน และ โพรตีนจะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้น โดยอาจจะเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย Clostridia และ Bacteriodes จากการเกิด Proteolysis ไปเป็น Saccharolysis นอกจากนี้สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกยังมีบทบาทในการส่งเสริมให้แบคทีเรียแลคติกผลิตสารที่สามารถยับยั้ง

แบคทีเรียที่จะผลิตสารก่อมะเร็งได้ และผลผลิตที่ได้จากการหมักมีผลต่อกลไกในการป้องกันการเกิดมะเร็ง เช่น กรดไขมันสายสั้น กลุ่มอะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวเทอเรท ซึ่งบิวเทอเรทเป็นสารที่มีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวเทอเรท ให้ได้ในปริมาณมากขึ้น นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้นทำให้พีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลงซึ่งมีผลให้ไปยับยั้งการสร้าง secondary bile acids ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (Wijnand, 1999) ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น β -glucuronidase และ nitroreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสร้างสารพิษและสารก่อมะเร็ง (Sako *et al.*, 1999; Rowland and Tanaka, 1993; Reddy, 1998) ลดจำนวนสารประกอบที่เป็นอันตรายต่างๆ เช่น แอมโมเนีย อินโดล และ พาราครีซอล (p-cresol) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้มะเร็งลูกกลามยิ่งขึ้น (Sako *et al.*, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 10 ซึ่งจากการศึกษาผลของโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และ อินนูลิน (inulin) ต่อการกระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ของหนู โดยใช้หนู 3 กลุ่ม หนูกลุ่มแรกได้รับประทานอาหารธรรมดา กลุ่มที่ 2 รับประทานอาหารที่มีการเติมโอลิโกฟรุคโตส 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาณ) กลุ่มที่ 3 รับประทานอาหารที่มีการเติมอินนูลิน 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาณ) หลังจากเลี้ยงไป 3 สัปดาห์ นำมาวิเคราะห์การเกิด apoptosis ในลำไส้ใหญ่ พบว่าอินนูลิน และ โอลิโกฟรุคโตส กระตุ้นการเกิด apoptosis ได้สูงกว่าหนูที่รับประทานอาหารธรรมดาเข้าไป (Hughes and Rowland, 2001)

3.3 เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ

กระบวนการหมักสารพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่สามารถเพิ่มการดูดซึมของสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี และเหล็ก (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001) โดยเฉพาะการดูดซึมของแคลเซียมถึงแม้ว่าการดูดซึมของแคลเซียมจะเกิดขึ้นเป็นหลักในลำไส้เล็ก แต่ยังคงมีการดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่อยู่บ้าง จากการศึกษาผลของอินนูลินต่อการดูดซึมและปรับสมดุลแร่ธาตุต่างๆ ในร่างกาย โดยให้อินนูลินแก่อาสาสมัครวัยผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพดีจำนวน 9 คน ในปริมาณ 40 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน พบว่าสามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม และปรับสมดุลแร่ธาตุให้ดีขึ้น และการให้โอลิโกฟรุคโตส และกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์แก่อาสาสมัครวันละ 15 กรัม เป็นเวลา 21 วัน พบว่าสามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม และธาตุเหล็กได้ (Coudray *et al.*, 1998) อ้างโดย Scholz-Ahrens *et al.*, 2001) และเมื่อให้หนูรับประทานอาหารที่มีแคลเซียม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับโอลิโกฟรุคโตส ปริมาณ 0, 25, 50 และ 100 กรัม เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่า หนูที่รับประทานแคลเซียมผสมกับโอลิโกฟรุคโตส สามารถเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมได้ดีขึ้น และจะมีการดูดซึมเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับโอลิโกฟรุคโตสเพิ่มขึ้น (Scholz-Ahrens *et al.*, 2001) ซึ่งกลไกในการเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่เกิดจากกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) ที่ จุลิ

นทรีย์ผลิตขึ้นมาระหว่างการหมักสารพรีไบโอติกส่งผลให้ค่าพีเอชภายในลำไส้ใหญ่ลดลง ทำให้แคลเซียมละลายได้ดีจึงมีการดูดซึมเพิ่มขึ้น และการใช้สารพรีไบโอติกของจุลินทรีย์ภายในลำไส้จะทำการเชื่อมที่จับอยู่สารที่อยู่ในกลุ่ม Phytate ถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระและมีการดูดซึมเข้าร่างกายได้ดังแสดงในภาพที่ 10

3.4 ลดระดับคอเลสเตอรอล

พบว่ากระบวนการหมักสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่มีผลให้สามารถไปลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Tuohy *et al.*, 2003) พบว่า *L. acidophilus* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ซึ่งจะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ โดย

3.4.1. ไปลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล สารกลุ่ม แพคติน กัวกัม (guar gum) และ β -glucan ที่มี fibers สูง จะสามารถลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ โดยลักษณะเหนียวหนืดของ fibers จะไปเคลือบผนังลำไส้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกายลดลง

3.4.2. ในกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น พบว่าโพรพิโอเนทสามารถไปลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ตับได้

3.4.3. เพิ่มการขับถ่ายเกลือน้ำดี (bile acid) ซึ่งเกลือน้ำดีเป็นตัวช่วยละลายไขมันทำให้การดูดซึมไขมันและคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

3.5 ช่วยลดความดันโลหิต

ได้มีการศึกษาถึงผลของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง โดยให้ผู้ป่วยบริโภค ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 มิลลิเมตรปรอท และยังพบว่าความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ Bifidobacteria ในลำไส้อีกด้วย (Tomomatsu, 1994)

3.6 ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด

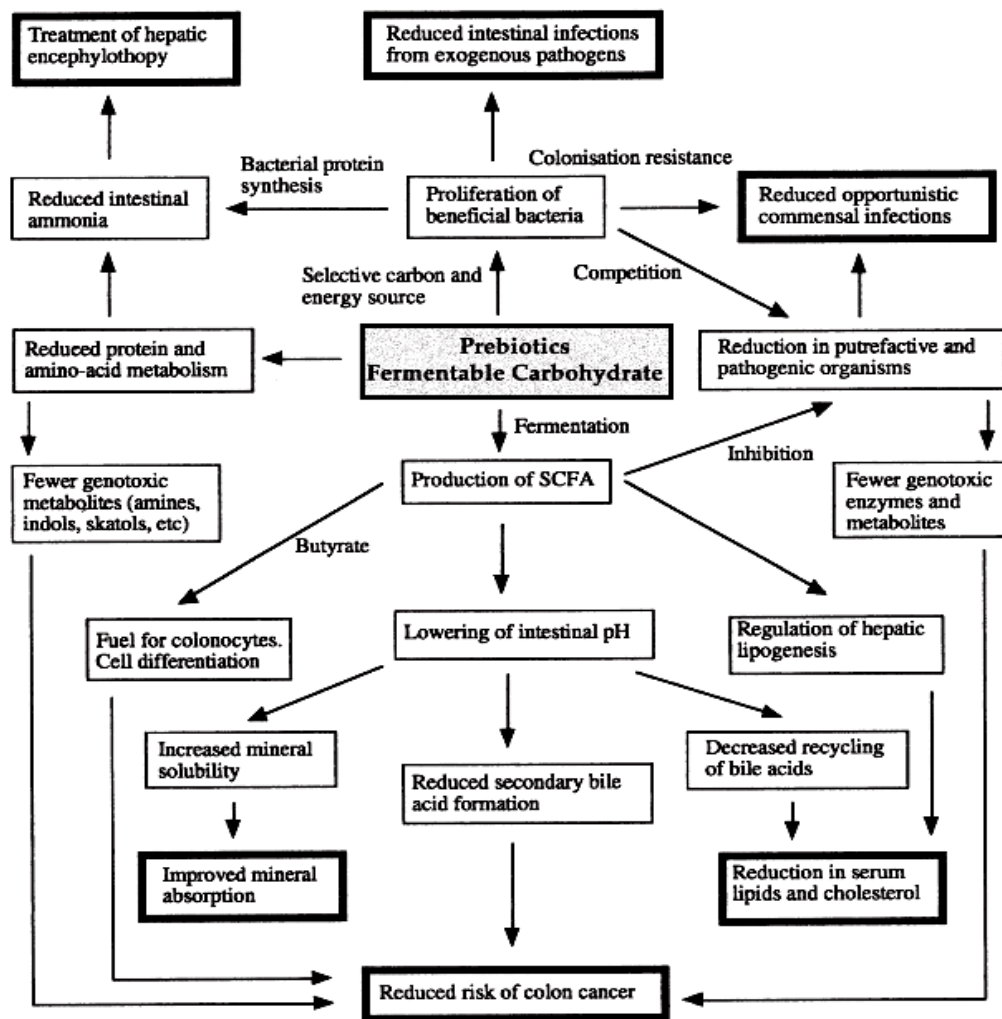
ในการหมักสารพรีไบโอติกโดยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria พบว่าสามารถผลิตวิตามิน B₁, B₂, B₆, B₁₂, nicotinic acid และ folic acid เพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

3.7 ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในร่างกายมนุษย์ สามารถจะสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึม สารกลุ่มโปรตีนซึ่งเป็นการหมักแบบ protolytic ดังนั้นมีการศึกษาถึงผลของโอลิโกแซคคาไรด์ ทั้งในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และทางห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าถ้าใช้โอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารตั้งต้นแก่จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยลดปริมาณสารพิษ และเอนไซม์ที่เป็นโทษลงเฉลี่ยประมาณ 44.6 และ 40.9 เปอร์เซ็นต์ (Tomomatsu, 1994)

3.8 ช่วยลดอาการท้องผูก

กรดไขมันซึ่งผลิตโดย Bifidobacteria จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้อุจจาระนิ่มขึ้นขับถ่ายได้ง่าย ซึ่งสารพรีไบโอติกสามารถเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้นในจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ (Tomomatsu, 1994)



ภาพที่ 10 กลไกการทำงานของสารพรีไบโอติกที่มีต่อการเสริมสร้างสุขภาพที่ดีให้ผู้บริโภค

Figure 10. Proposed mechanisms of prebiotic action to improve human health.

ที่มา: Suskovic และ คณะ (2001)

4. ซินไบโอติก (Synbiotic)

ซินไบโอติก (Synbiotic) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการรวมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติกและสารพรีไบโอติก ซึ่งจะมีผลการส่งเสริมการเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในทางเดินอาหาร ซึ่งจะช่วยให้แบคทีเรียโปรไบโอติกในทางเดินอาหารมีชีวิตรอดมากขึ้น เกิดการเกาะติดผนังลำไส้ และสามารถเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่ได้ดีขึ้น ส่งผลให้สุขภาพของเซลล์เจ้าบ้านดีขึ้น (Fook *et al.*, 1999; Roberfroid, 2000; Tuohy *et al.*, 2003) พบว่าผู้ที่รับประทานโยเกิร์ตที่มี *L. acidophilus* และมีส่วนผสมของ FOS สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Schaafsma *et al.*, 1998 อ้างโดย Tuohy *et al.*, 2003) และจากการให้หนูรับประทานผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกที่มีการผสมสารพรีไบโอติกชนิดโอลิโกฟรุกโตส 5 เปอร์เซนต์ ผสมกับ Bifidobacteria ที่มีชีวิตปริมาณ $\geq 10^9$ เซลล์ เปรียบเทียบกับหนูที่กินอาหารปกติ และหนูที่มีการกินแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูที่กินผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ประมาณ 1.4 Log CFU ต่อกรัมอุจจาระ เมื่อเปรียบเทียบการให้หนูกินแต่ Bifidobacteria เพียงอย่างเดียวมีการเพิ่มขึ้นแค่ 0.6 Log CFU ต่อกรัมอุจจาระ (Bielecka *et al.*, 2002)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกที่แยกจากทางเดินอาหารสัตว์ทะเล และจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้
2. เพื่อคัดเลือกสารสกัดจากพืชหัวชนิดต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดที่คัดเลือกได้

ขอบเขตการวิจัย

ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากทางเดินอาหารของสัตว์ทะเลแล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือ ทดสอบการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และการทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารส่วนบนไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติก และทำการคัดเลือกสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากพืชหัวชนิดต่างๆ โดยนำมาสกัดด้วยเอทานอล และนำสารสกัดที่ได้มาทดสอบการทนต่อกรด

ย่อยด้วยกรดและเอนไซม์อะไมเลส เพื่อคัดเลือกสารสกัดที่ทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์อะไมเลสมาศึกษาผลของสารสกัดนั้นต่อการเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* และ *Bifidobacterium bifidum* โดยนำน้ำหมักที่ได้มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) ที่ได้จากการหมัก จากนั้นนำโปรไบโอติกและสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมาเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) กับจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งศึกษาคูณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัด เช่น น้ำหนักโมเลกุล และชนิดของน้ำตาล เป็นต้น